



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104910229 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201510212788. 7

(22) 申请日 2015. 04. 30

(71) 申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路 5 号

(72) 发明人 段海峰 黄岩谊 陈子天 谢晓亮

(51) Int. Cl.

C07H 19/207(2006. 01)

C07H 19/10(2006. 01)

C07H 1/00(2006. 01)

C09K 11/06(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书3页 说明书10页 附图2页

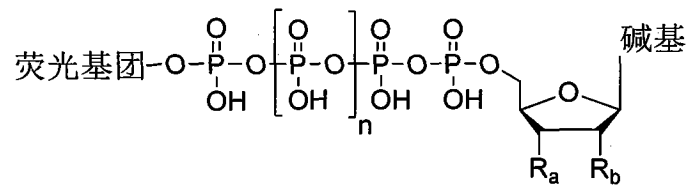
(54) 发明名称

多聚磷酸末端荧光标记核苷酸及其应用

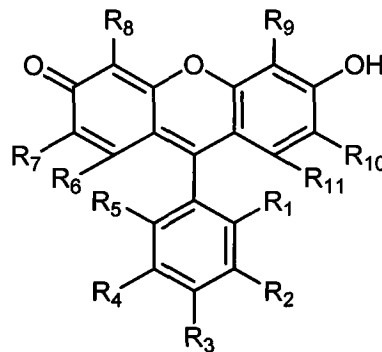
(57) 摘要

本发明涉及一类 5' - 末端磷酸荧光标记的核苷酸, 提供了分子结构及合成方法。该类分子可以更好地被 DNA 聚合酶所识别, 且在被聚合酶识别并反应结合之后在碱性磷酸酶协助下快速实现荧光信号由关闭向开启状态转变, 从而作为聚合酶底物可以被应用于核酸序列测定等等领域中。

1. 一种末端磷酸荧光标记的核苷酸结构,其特征在于:具有如下通式(1)所示结构



其中 R_a, R_b 可以独立的选自 $-H, -OH$; n 为大于等于 1, 并且小于等于 5 的整数;
其中,通式(1)中的荧光基团具备下面通式(2)所述结构,



其中,通式(2)中 R_1, R_5 可独立的选自 $-H$ 、氟、氯、溴、芳基、取代芳基、C1-C6 烷基、取代的 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、取代的 C1-C6 烷氧基;

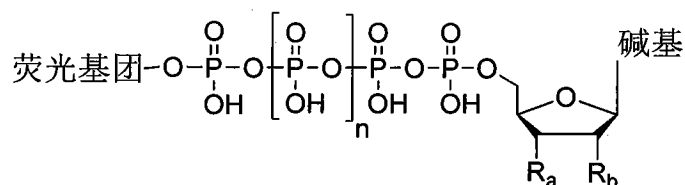
$R_{2-4}, R_{6-8}, R_{9-11}$ 可以独立的选自 $-H$ 、氟、氯、溴、芳基、取代芳基、杂芳基、 $-CO_2H, -CO_2R, -SO_3H, -SO_3R, -CH_2CO_2H, -CH_2CO_2R, -CH_2SO_3H, -CH_2SO_3R, -CH_2NH_2, -CH_2NHR, -NO_2$ 、C1-C6 烷基、取代的 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、取代的 C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷氧基芳基、取代的 C1-C6 烷氧基芳基、苯基、取代苯基、联苯基、取代联苯基、苄基、取代苄基、苯甲酰基、取代苯甲酰基,其中 R 选自 C1-C6 烷基、取代的 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、取代的 C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷氧基芳基、取代的 C1-C6 烷氧基芳基、苯基、取代苯基、联苯基、取代联苯基、苄基、取代苄基、苯甲酰基、取代苯甲酰基。

2. 一种合成末端磷酸荧光标记的核苷酸结构的方法,其特征在于包括以下步骤:

(a) 三偏磷酸盐与荧光染料基团的羟基反应,生成中间体荧光基团修饰的三偏磷酸中间体;

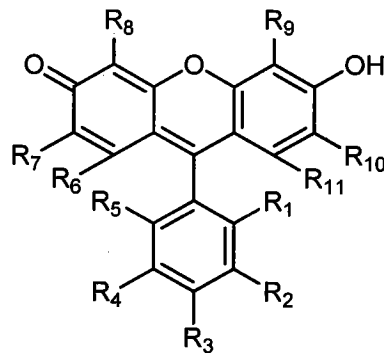
(b) 选用带有 5' - 磷酸链的核苷与荧光基团修饰的三偏磷酸中间体反应,转化成产物 5' - 多聚磷酸末端荧光标记核苷酸;

其中,所述的末端磷酸荧光标记的核苷酸结构具有如下通式(1)所示结构



其中 R_a, R_b 可以独立的选自 $-H, -OH$; n 为大于等于 1, 并且小于等于 5 的整数。

3. 根据权利要求 2 所述的合成方法,其特征在于,通式(1)中的荧光基团具备下面通式(2)所述结构,



其中,通式(2)中 R_1, R_5 可独立的选自-H、氟、氯、溴、芳基、取代芳基、C1-C6烷基、取代的C1-C6烷基、C1-C6烷氧基、取代的C1-C6烷氧基;

$R_{2-4}, R_{6-8}, R_{9-11}$ 可以独立的选自-H、氟、氯、溴、芳基、取代芳基、杂芳基、 $-CO_2H, -CO_2R, -SO_3H, -SO_3R, -CH_2CO_2H, -CH_2CO_2R, -CH_2SO_3H, -CH_2SO_3R, -CH_2NH_2, -CH_2NHR, -NO_2$ 、C1-C6烷基、取代的C1-C6烷基、C1-C6烷氧基、取代的C1-C6烷氧基、C1-C6烷氧基芳基、取代的C1-C6烷氧基芳基、苯基、取代苯基、联苯基、取代联苯基、苄基、取代苄基、苯甲酰基、取代苯甲酰基,其中R选自C1-C6烷基、取代的C1-C6烷基、C1-C6烷氧基、取代的C1-C6烷氧基、C1-C6烷氧基芳基、取代的C1-C6烷氧基芳基、苯基、取代苯基、联苯基、取代联苯基、苄基、取代苄基、苯甲酰基、取代苯甲酰基。

4. 根据权利要求1或2所述的内容,其特征在于, n 值为3、4或5。

5. 根据权利要求1或2所述的内容,其特征在于,

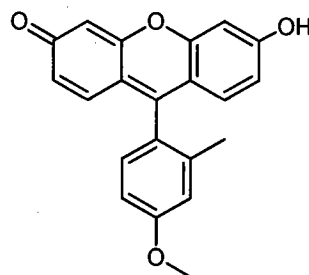
通式(1)中碱基可以选自腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)、修饰的核苷碱基或非天然的核苷碱基。

6. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,

所述步骤(a)中,三偏磷酸盐在活化试剂存在下被活化,再与荧光染料基团的羟基反应,生成中间体荧光基团修饰的三偏磷酸。活化试剂可以为酰氯,磺酰氯,氯化砒,氯化亚砒,二氯亚砒等。

7. 根据权利要求2所述的合成方法,其特征在于,所述核苷酸结构为2'-脱氧核苷-5'-单磷酸(dNMP)、2'-脱氧核苷-5'-二磷酸(dNDP)或者2'-脱氧核苷5'-三磷酸(dNTP)。

8. 根据权利要求1或2所述的内容,其特征在于,所述荧光基团对应的荧光分子为以下结构,



9. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,首先将荧光基团与活化的三偏磷酸反应,生成荧光基团三偏磷酸复合物中间体,再与核苷5'-单磷酸或者核苷5'-二磷酸或者核苷5'-三磷酸或者5'-多磷酸反应。

10. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在於,其中所述方法不包括所述核苷的氨基和 / 或羟基的保护和 / 或去保护。

11. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在於,所述方法为一锅式反应,中间不需要分离纯化所述中间体。

12. 根据前面任一项权利要求所述的内容,其特征在於,所述末端磷酸荧光标记的核苷酸结构可以作为 DNA 或 RNA 聚合酶底物,被 DNA 或 RNA 聚合酶识别并掺入到 DNA 或 RNA 链中去,并释放出荧光基团标记的多聚磷酸分子。

13. 根据权利要求 12 所述的内容,其特征在於,所述末端磷酸荧光标记的核苷酸结构可以作为碱性磷酸酶的底物被继续分解,直至全部磷酸基团从荧光分子上脱离。

14. 根据前面任一项权利要求所述的内容,其特征在於,所述末端磷酸荧光标记的核苷酸结构在被分解并释放出荧光基团之前为荧光关闭状态,被激发光照射时不显著发出荧光信号。

15. 根据前面任一项权利要求所述的内容,其特征在於,所述末端磷酸荧光标记的核苷酸结构被聚合酶和碱性磷酸酶分解后释放出荧光基团,在激发光照射时显著发出荧光信号。

16. 根据前面任一项权利要求所述的内容,其特征在於,所述荧光基团的激发光波长范围为 470-535nm,发射光波长范围为 510-570nm。

17. 根据前面任一项权利要求所述的内容,其特征在於,式 (1) 所述末端磷酸荧光标记的核苷酸结构为 5' - 末端 - ζ - 磷酸荧光标记的核苷酸六磷酸酯、5' - 末端 - η - 磷酸荧光标记的核苷酸七磷酸酯或者 5' - 末端 - θ - 磷酸荧光标记的核苷酸八磷酸酯。

18. 一种末端磷酸荧光标记的核苷酸分子,其特征在於,荧光基团连接 6-8 个磷酸分子,然后依次连接到核糖以及碱基;

其中所述荧光标记的核苷酸分子是通过三偏磷酸盐与荧光染料基团的羟基反应,然后再与带有 5' - 磷酸链的核苷发生反应获得的;

所述末端磷酸荧光标记的核苷酸分子可以被 DNA 聚合酶所识别,并且在反应结合之后在碱性磷酸酶协助下可以实现荧光信号由关闭向开启状态转变。

19. 一种末端磷酸荧光标记的核苷酸分子的合成方法,其特征在於,荧光基团连接 6-8 个磷酸分子,然后依次连接到核糖以及碱基;

其中所述荧光标记的核苷酸分子是通过三偏磷酸盐与荧光染料基团的羟基反应,然后再与带有 5' - 磷酸链的核苷发生反应获得的;

所述末端磷酸荧光标记的核苷酸分子可以被 DNA 聚合酶所识别,并且在反应结合之后在碱性磷酸酶协助下可以实现荧光信号由关闭向开启状态转变。

20. 根据前面任一项权利要求所述的内容,其特征在於,所述末端磷酸荧光标记的核苷酸结构为 6 磷酸结构或者 7 磷酸结构或者 8 磷酸结构。

21. 一种利用末端磷酸荧光标记的核苷酸结构进行基因测序的方法,其特征在於所述核苷酸结构为权利要求 1-18 中任一项限定的核苷酸结构。

多聚磷酸末端荧光标记核苷酸及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一类 5' - 末端磷酸荧光标记的核苷酸,及其在核酸序列测定过程中的应用。

背景技术

[0002] 在 DNA 聚合酶参与的 DNA 复制放大、核苷酸序列边合成边测定等应用中,都涉及到核苷酸分子的标记技术,近年来,荧光标记的核苷酸被充分运用到 DNA 高通量测序技术中,其中,标记技术之一是将不同的荧光基团通过可切断长链连接到核苷酸碱基的特定位置上,在 DNA 完成识别并记录荧光信号之后通过额外的化学手段去除该标记基团,进而为下一轮的核苷酸导入做准备。该技术现已被 illumina 公司为代表的商业机构发展成熟并占据主要市场应用地位 (US 7057026 ;7566537)。但这种在核苷酸碱基上进行荧光标记的方式仍然存在一定的局限 —— 每次化学切除标记分子所存留的 ' 分子疤痕 ' 都造成新合成的 DNA 分子在一定程度后不可避免的形态改变,阻止聚合酶分子的有效结合,从而影响测序应用的读取长度。因而,发展新的核苷酸标记手段,进而发展新的 DNA 测序技术都是目前市场需求和科学研究追逐的热点。相对于在核苷酸碱基上进行标记的技术,在核苷酸的 5' - 磷酸末端进行标记的技术也很早就应用于生物化学和有关的生物技术研究中。通过在末端磷酸位置上引入不同功能的标记物,可以帮助人们了解各种核苷酸参与的生理过程。这种在磷酸末端进行标记的特点是,聚合酶在正确识别并反应结合受标记的核苷酸后,将切断并释放剩余部分的带有标记物的多磷酸基团,新合成的 DNA 上没有残留基团或分子片段,从而保证里新合成 DNA 的自然结构。这有利于聚合酶在长区间内连续引入碱基的快速性和准确性。这些潜在特点驱使着人们将 5' - 末端磷酸标记核苷酸应用到诸如高通量 DNA 测序、单核苷酸多态性筛查等方面的实际应用中。然而,保证这些应用的关键之处还在于在核苷酸的 5' - 磷酸末端引入标记基团特别是荧光标记基团后,该核苷酸能被 DNA 聚合酶顺利的识别出来。2005 年 Sood 等人的研究中已经证明 (Sood, A. 等 J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 2394), 将荧光标记分子直接连接在三磷酸脱氧核糖核苷酸 (dNTP) 的末端磷酸上并不是理想的标记方式,因为一方面标记上的荧光基团占用了磷酸链上的一个负电荷,减少了磷酸与 DNA 聚合酶催化中心金属离子的结合能力 ;另一方面,荧光基团所造成的位阻效应使得核苷酸不容易接近并进入 DNA 聚合酶的活性催化中心,从而减缓了 DNA 聚合酶对带有标记的正确核苷酸分子的识别速率。因而,研究合成具有长链末端磷酸荧光标记的核苷酸是人们要实现的目标。

[0003] 在研究长链末端磷酸荧光标记的方法中,有两个不同的方向,其中一个方向是作为标记的荧光分子在 DNA 聚合酶作用前后的各种阶段荧光性质保持不变,因而可以使用长的化学惰性链接分子将荧光标记物 ' 锚定 ' 在核苷酸的末端磷酸上,这一技术以 Stephen W. Turner 等人发展的末端磷酸标记技术为代表 (Nucleosides, Nucleotides&Nucleic Acids, 2008, 27, 1072-1083) ;尽管这种技术可以实现标记分子远离聚合酶催化位点,但由于不能体现聚合酶将核苷酸结合到新合成 DNA 上这一过程前后的荧光变化,因而只能应用

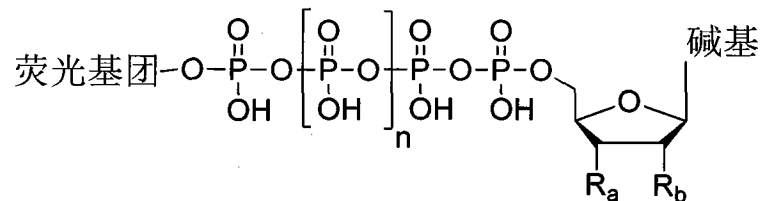
于特定的场合。第二种技术,也就是本发明所讨论的标记技术,是所标记的荧光分子在与其共价结合的磷酸分子在'结合'和'解离'两个状态下存在荧光性质的'关闭'和'开启'状态的不同,或者说在荧光标记分子处于与末端磷酸的结合状态时其荧光性质处于淬灭状态,不能被特定波长的激发光所激发;而一旦被聚合酶和磷酸酶所释放后立即回到可激发状态,从而给出荧光信号。这一特定的性质为我们发展基于荧光信号产生的诸如 DNA 高通量测序技术等应用提供了前提。

[0004] 为解决标记分子与聚合酶催化活性中心之间的位阻问题,人们在合成更长的多聚磷酸链方面作了很多工作(Shiv Kumar 等 Nucleosides, Nucleotides&Nucleic Acids, 2005, 24, 401;),但往往都存在合成方法不直接、长链合成困难等问题。因而,一方面,我们要开发新的合成具有更长的多聚磷酸链的末端标记核苷酸分子的方法,另一方面,选择吸收系数、量子产率高,淬灭效果好,激发波长适合的荧光分子也是本发明的重要方面。

发明内容

[0005] 本发明涉及一类 5' - 末端磷酸荧光标记的核苷酸,提供了分子结构及合成方法。该类分子可以更好地被 DNA 聚合酶所识别,且在被聚合酶识别并反应结合之后在碱性磷酸酶协助下快速实现荧光信号由关闭向开启状态转变,从而作为聚合酶底物可以被应用于核酸序列测定等等领域中。

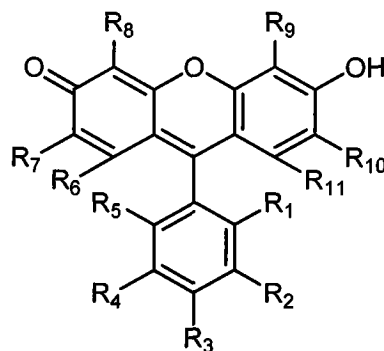
[0006] 本发明提供一种末端磷酸荧光标记的核苷酸结构,具有如下通式(1)所示结构
[0007]



[0008] 其中 R_a, R_b 可以独立的选自 $-H, -OH$; n 为大于等于 1, 并且小于等于 5 的整数;

[0009] 其中,通式(1)中的荧光基团具备下面通式(2)所述结构,

[0010]



[0011] 其中,通式(2)中 R_1, R_5 可独立的选自 $-H$ 、氟、氯、溴、芳基、取代芳基、C1-C6 烷基、取代的 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、取代的 C1-C6 烷氧基;

[0012] $R_{2-4}, R_{6-8}, R_{9-11}$ 可以独立的选自 $-H$ 、氟、氯、溴、芳基、取代芳基、杂芳基、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3R$ 、 $-CH_2CO_2H$ 、 $-CH_2CO_2R$ 、 $-CH_2SO_3H$ 、 $-CH_2SO_3R$ 、 $-CH_2NH_2$ 、 $-CH_2NHR$ 、 $-NO_2$ 、C1-C6 烷基、取代的 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、取代的 C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷氧基芳基、取代的 C1-C6 烷氧

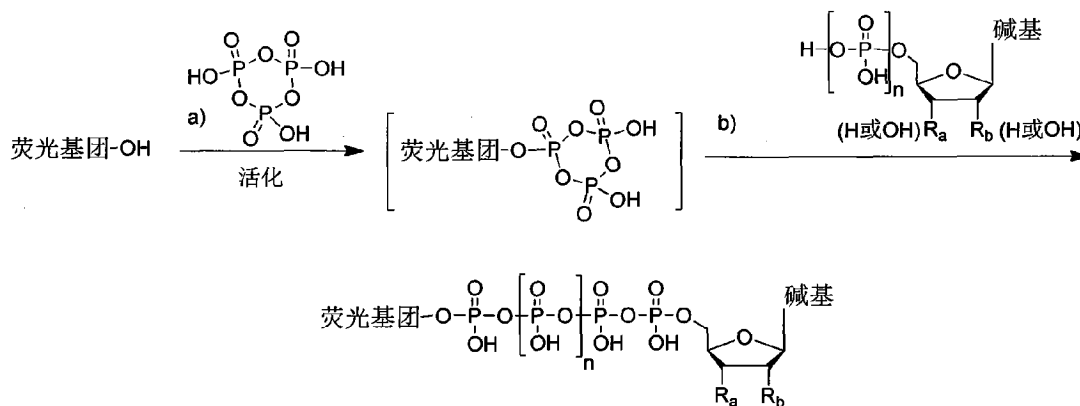
基芳基、苯基、取代苯基、联苯基、取代联苯基、苄基、取代苄基、苯甲酰基、取代苯甲酰基，其中 R 选自 C1-C6 烷基、取代的 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、取代的 C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷氧基芳基、取代的 C1-C6 烷氧基芳基、苯基、取代苯基、联苯基、取代联苯基、苄基、取代苄基、苯甲酰基、取代苯甲酰基。

[0013] 同时，本发明提供一种合成末端磷酸荧光标记的核苷酸结构的方法，其特征在于包括以下步骤：

[0014] (a) 三偏磷酸盐与荧光染料基团的羟基反应，生成荧光基团修饰的三偏磷酸中间体；

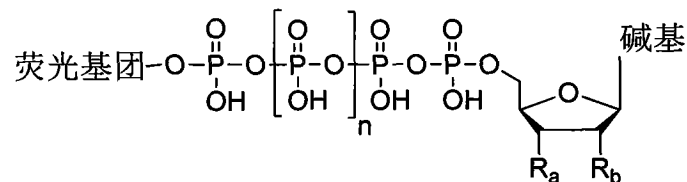
[0015] (b) 选用带有 5' - 磷酸链的核苷与荧光基团修饰的三偏磷酸中间体反应，转化成产物 5' - 多聚磷酸末端荧光标记核苷酸。

[0016]



[0017] 其中，所述的末端磷酸荧光标记的核苷酸结构具有如下通式 (1) 所示结构

[0018]



[0019] 其中 R_a , R_b 可以独立的选自 -H, -OH; n 为大于等于 1, 并且小于等于 5 的整数。本发明提供的合成末端磷酸荧光标记的核苷酸结构的方法，其对于荧光分子并没有特殊的要求，比如含有羟基的氧杂蒽类、香豆素、试卤灵类荧光分子。

[0020] 根据本发明的优选的实施方式，所述的荧光基团优选通式 (2) 所述的结构。

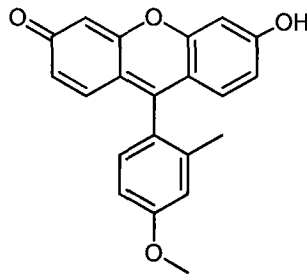
[0021] 根据本发明的另一个优选的实施例， n 值为 3、4 或 5。

[0022] 其中，通式 (1) 中碱基可以选自腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G)、胞嘧啶 (C)、胸腺嘧啶 (T)、尿嘧啶 (U)、修饰的核苷碱基或非天然的核苷碱基。

[0023] 根据本发明的优选的实施方式，合成末端磷酸荧光标记的核苷酸结构方法的步骤 (a) 中，三偏磷酸盐在活化试剂存在下被活化，再与荧光染料基团的羟基反应，生成中间体荧光基团修饰的三偏磷酸。活化试剂可以为酰氯，磺酰氯，氯化砒，氯化亚砒，二氯化砒等。

[0024] 根据本发明的优选的实施方式，合成末端磷酸荧光标记的核苷酸结构方法中，所述核苷酸结构为 2' - 脱氧核苷 5' - 单磷酸 (dNMP)、2' - 脱氧核苷 5' - 二磷酸 (dNDP) 或者 2' - 脱氧核苷 5' - 三磷酸 (dNTP)。

[0025] 根据本发明另一个优选的实施例,所述荧光基团对应的荧光分子为以下结构,
[0026]



[0027] 根据本发明的优选的实施方式,合成末端磷酸荧光标记的核苷酸结构方法中,首先将荧光基团先与活化的三偏磷酸盐反应,生成荧光基团三偏磷酸复合物中间体,再与核苷 5' - 单磷酸或者核苷 5' - 二磷酸或者核苷 5' - 三磷酸或者 5' - 多磷酸反应。

[0028] 根据本发明的优选的实施方式,所述方法为一锅式反应,中间不需要分离纯化所述中间体。所述方法不包括所述核苷的氨基和 / 或羟基的保护和 / 或去保护。

[0029] 本发明所提供的末端磷酸荧光标记的核苷酸结构,可以作为 DNA 或 RNA 聚合酶底物,被 DNA 或 RNA 聚合酶识别并掺入到 DNA 或 RNA 链中去,并释放出荧光基团标记的多聚磷酸分子。所述末端磷酸荧光标记的核苷酸结构可以作为碱性磷酸酶的底物被继续分解,直至全部磷酸基团从荧光分子上脱离。

[0030] 所述末端磷酸荧光标记的核苷酸结构在被分解并释放出荧光基团之前为荧光关闭状态,被激发光照射时不显著发出荧光信号。所述末端磷酸荧光标记的核苷酸结构被聚合酶和碱性磷酸酶分解后释放出荧光基团,在激发光照射时显著发出荧光信号。所述荧光基团的激发光波长范围为 470-535nm,发射光波长范围为 510-570nm。

[0031] 根据本发明优选的实施方式,式 (1) 所述末端磷酸荧光标记的核苷酸结构为 5' - 末端 - ζ - 磷酸荧光标记的核苷酸六磷酸酯、5' - 末端 - η - 磷酸荧光标记的核苷酸七磷酸酯或者 5' - 末端 - θ - 磷酸荧光标记的核苷酸八磷酸酯。

[0032] 本发明还提供一种末端磷酸荧光标记的核苷酸分子及其合成方法,其结构为荧光基团连接 6-8 个磷酸分子,然后依次连接到核糖以及碱基;其中所述荧光标记的核苷酸分子是通过三偏磷酸盐与荧光染料基团的羟基反应,然后再与带有 5' - 磷酸链的核苷发生反应获得的;所述末端磷酸荧光标记的核苷酸分子可以被 DNA 聚合酶所识别,并且在反应结合之后在碱性磷酸酶协助下可以实现荧光信号由关闭向开启状态转变。

[0033] 本发明的优点之一在于所发明的核苷酸分子结构中荧光标记基团只在 5' - 多聚磷酸末端位置,因而作为 DNA 聚合酶底物用于 DNA 合成等相关应用中时不产生分子疤痕,故而不影响新产生的 DNA 分子结构。优点之二在于本发明提供的荧光标记核苷酸分子在 DNA 聚合酶结合反应之前为荧光关闭状态,在反应之后随磷酸酶的水解转变为荧光开启状态。优点之三为本发明提供了一种方便的制备长链荧光标记多聚磷酸核苷酸的反应方法,本方法利用了商业化易得的三偏磷酸钠为初始原料之一,首先将其与荧光分子结合,方便的形成了活化状态的荧光标记环化磷酸酯,再于易得的多磷酸核苷反应制备目标分子,多磷酸链长更长的优势。本发明提供的制备荧光标记多聚磷酸核苷酸的反应方法,比通过核苷成环反应制备荧光标记多聚磷酸核苷酸的方法不仅方法简单,也避免了成环后副产物的产生,提高了制备效率,使得产品产率明显提高,有多磷酸链长更长的优势。

附图说明

[0034] 图 1. a) TG-dA6P 自身的吸收光谱 (虚线所示); b) 单独的磷酸酶对 TG-dN6P 没有反应 (半虚线所示); c) 磷酸二酯酶将磷酸链断开, 磷酸酶迅速水解并释放出荧光基团 (实线所示)。其中虚线和半虚线基本重合。

[0035] 图 2. TG-dA6P 自身荧光 (荧光淬灭状态, 虚线所示) 与经过聚合酶 (BST) 结合和磷酸酶 (CIP) 水解去除磷酸之后的荧光强度 (荧光开启状态, 实线所示) 对比。

[0036] 图 3. TG-dA6P 在聚合酶存在下对不同长度重复碱基 (碱基同聚物) 模板的延伸情况 (从下至上分别为单碱基, 二碱基, 四碱基和八碱基)。

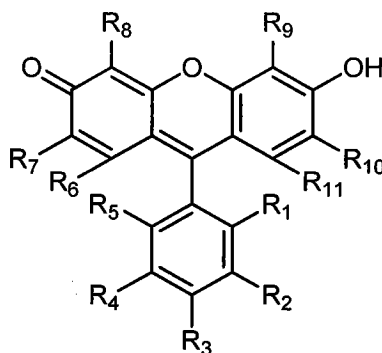
具体实施方式

[0037] 在公开描述本发明的化合物、复合物、反应体系、装置、系统 / 或方法之前, 应该理解这些在具体实施方式提到的特定合成方法、所用物品、装置, 特殊试剂 (除非另外给出) 等仅是对于本发明的进一步说明, 所使用的术语也仅仅用于描述特定形式, 并不够成本发明的限制因素。

[0038] 实施例 1:

[0039] 提供了一种荧光素类似物——碳桥取代的荧光素或者葱类荧光素, 具有长波长, 荧光可生性衍生化简单易行, 消光系数和量子产率堪比荧光素的染料分子, 具有下列结构通式 (1):

[0040]



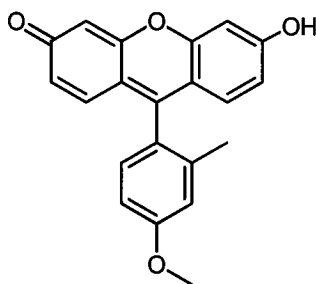
[0041] 其中, R1, R5 可独立的选自 -H、氟、氯、溴、芳基、取代芳基、C1-C6 烷基、取代的 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、取代的 C1-C6 烷氧基;

[0042] R2-4, R6-8, R9-11 可以独立的选自 -H、氟、氯、溴、芳基、取代芳基、杂芳基、-CO2H、-CO2R、-SO3H、-SO3R、-CH2CO2H、-CH2CO2R、-CH2SO3H、-CH2SO3R、-CH2NH2、-CH2NHR、-NO2、C1-C6 烷基、取代的 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、取代的 C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷氧基芳基、取代的 C1-C6 烷氧基芳基、苯基、取代苯基、联苯基、取代联苯基、苄基、取代苄基、苯甲酰基、取代苯甲酰基, 其中 R 选自 C1-C6 烷基、取代的 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、取代的 C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷氧基芳基、取代的 C1-C6 烷氧基芳基、苯基、取代苯基、联苯基、取代联苯基、苄基、取代苄基、苯甲酰基、取代苯甲酰基。

[0043] 实施例 2

[0044] 根据实施例 1 所述的化合物, 其具体可以为:

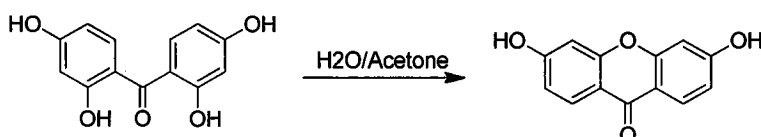
[0045]



[0046] 实施例 3

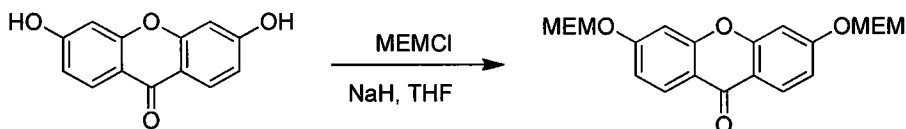
[0047] 根据实施例 2 所述的化合物,其合成方法具体可以如下:

[0048]



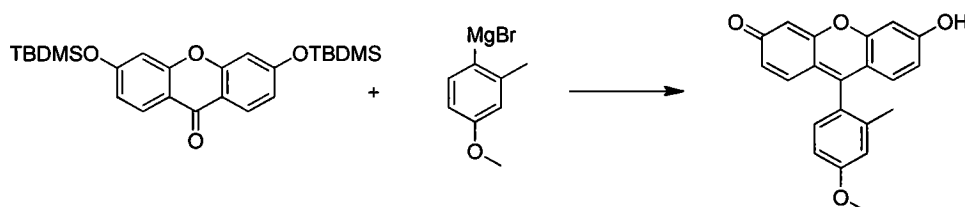
[0049] 取 2,2',4,4'-四羟基二苯甲酮 (5g, 20.3mmol) 放入特种耐压厚壁反应瓶中,加入 70ml 水中,再加入 10ml 丙酮,旋塞密封此反应瓶,外浴加热至 200℃ 反应 6 小时 (在通风柜中小心隔离屏蔽),反应物由悬浊状态到澄清,再到产物析出的浑浊状态,反应完毕后冷却至室温,过滤析出的淡黄色产物,水洗,减压干燥,得到所需产物 3,6-二羟基苯并吡喃酮,收率 94%,如需进一步纯化可用乙醇/水进行重结晶。熔点 319 ~ 321℃。

[0050]



[0051] 将 3,6-二羟基苯并吡喃酮 (4g, 17.5mmol) 加入干燥的 250ml 反应瓶,氮气保护下加入 80ml 无水 N,N-二甲基甲酰胺溶液,搅拌下加入咪唑 (0.17mol),随后加入叔丁基二甲基氯化硅 (0.1mol),保持室温反应 4 ~ 15 小时,反应结束后倒入冰水,混合相用乙酸乙酯萃取,合并有机相后用饱和食盐水洗,Na₂SO₄干燥,旋转蒸发去除溶剂后,剩余固体物质用乙醇重结晶,得到白色针状晶体 (75%)。熔点:154-156℃。¹H NMR(CDCl₃, 500MHz): δ 8.16(d, J = 10Hz, 2H, Ar-H), 6.81(m, 4H, Ar-H), 0.92(s, 18H, CH₃), 0.21(s, 12H, CH₃)。

[0052]



[0053] 在 250ml 干燥反应瓶中,加入上一步产物 3,6-二(叔丁基二甲硅氧)基苯并吡喃酮 (5g, 11mmol),氮气保护下无水四氢呋喃 80ml,冷却到 0℃,滴加 4-甲氧基-2-甲基苯基格氏试剂 (16.5mmol),滴加完毕后保持 0℃ 反应 1-4 小时,反应完毕后将反应体系倾倒入 3N HCl 水溶液中 (100ml),搅拌,过滤析出的黄色固体物质,此固体物质经干燥后得到较纯的目标产物-标记为 TG。进一步纯化可以采用硅胶柱层析法。收率 85%。¹H NMR(500MHz,

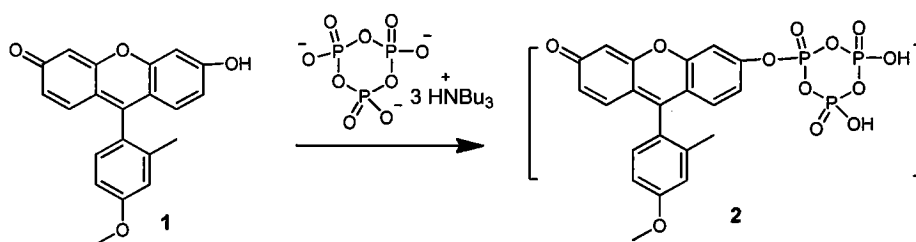
CD₃OD) δ 7.62 (d, J = 9.5Hz, 2H, Ar-H), 7.32 (d, J = 2.3Hz, 2H, Ar-H), 7.24 (d, J = 7.8Hz, 1H, Ar-H), 7.21 (dd, J = 2.3, 9.4Hz, 2H, Ar-H), 7.11 (d, J = 2.0Hz, 1H, Ar-H), 7.05 (dd, J = 2.4, 8.7Hz, 1H, Ar-H), 3.91 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), HRMS :Calcd for C₂₁H₁₆O₄(M+H), 333.1127Found, m/z 333.1185. 在知晓合成路径的基础上,获得化合物 TG 的方法、条件都属于常规技术。并且,在本实施例的基础上,获得实施例 1 所述其它取代基的化合物属于有经验的本领域化学合成人员可以做到的。

[0054] 实施例 4.

[0055] 合成 5' - ζ - 末端磷酸荧光标记的 2' - 脱氧核苷六磷酸酯

[0056] 1) 合成染料三偏磷酸酯活性中间体

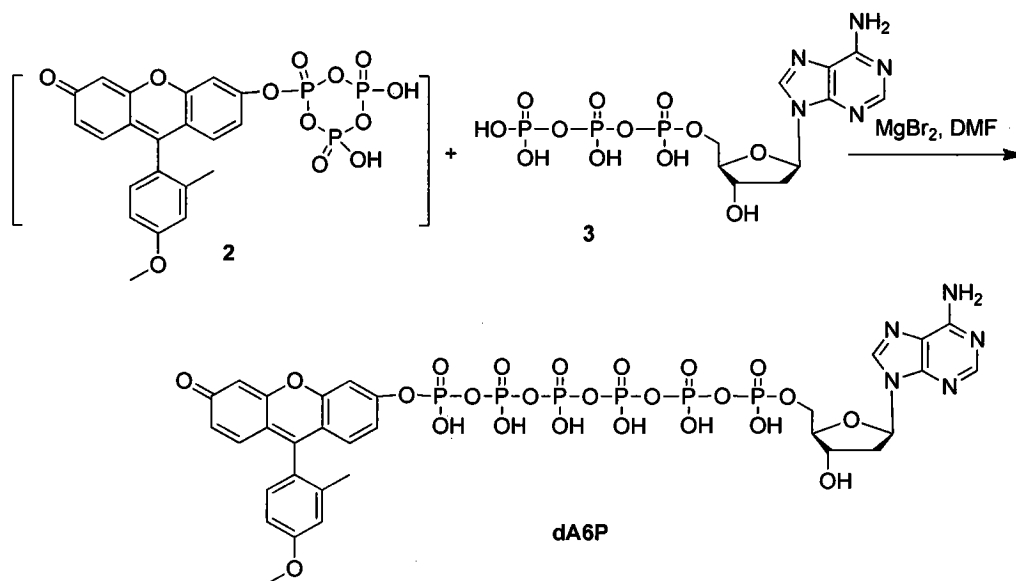
[0057]



[0058] 取三偏磷酸钠 (355mg, 1.16mmol) 溶于适量去离子水,此溶液经过离子交换柱 (BioRad AG-50W-XB 阳离子交换树脂) 处理置换为三偏磷酸三丁基胺盐,将此胺盐的水溶液经冷冻干燥,再经油泵真空抽干 12h,得到干燥的三偏磷酸三丁基胺盐固体。在氩气氛围下,将此固体放入干燥的 25mL 圆底反应瓶中,向此反应瓶中加入无水干燥的 10mL 乙腈溶液,将此溶液在搅拌情况下冷却 (冷却 10 ~ -10℃,这里选 0℃),向溶液中滴加入二氯亚砷 (109μL) 以及 DMAP (对二甲氨基吡啶) (8mg),随后加入 430mg 三丁基胺。随后此溶液在 0℃ 下搅拌 1 ~ 30 分钟,然后将荧光标记染料 1 (167mg, 0.5mmol) 加入到上述反应液中,该混合反应液在 0℃ 到室温的条件下搅拌反应 1 ~ 5 小时,直至 HPLC 检测大部分的荧光染料原料消失即可停止反应,此溶液包含中间体化合物 2。该溶液可保存在 -20℃ 冰箱中待用。

[0059] 2) 合成 5' - ζ - 末端磷酸荧光标记的 2' - 脱氧核苷六磷酸酯

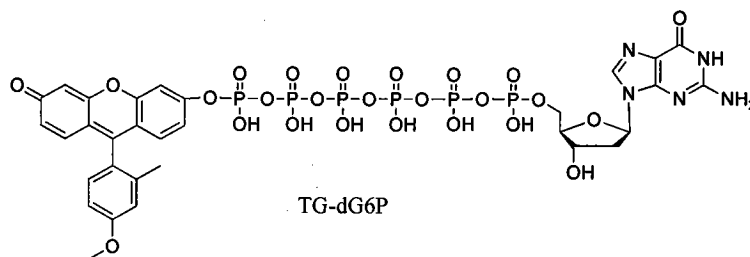
[0060]



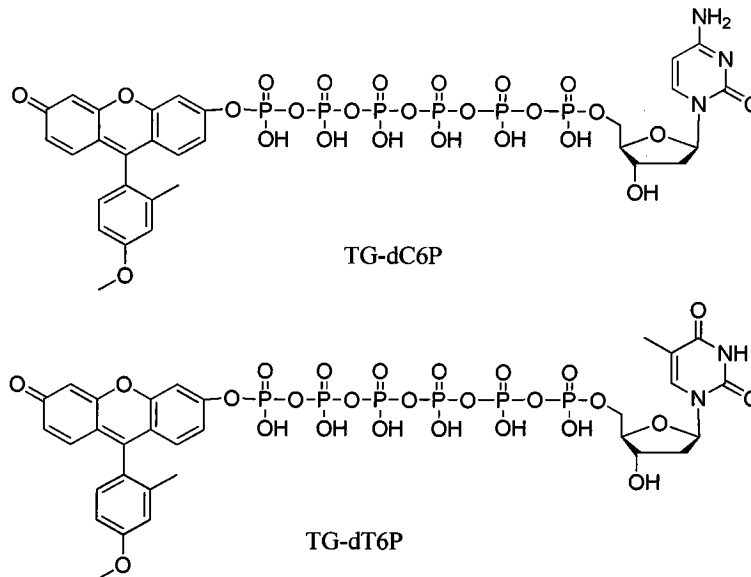
[0061] 取 2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸二钠盐 (50 μ mol) 溶于 1ml 去离子水溶液, 将此溶液经过离子交换柱 (BioRad AG-50W-XB 阳离子交换树脂) 处理, 转换为 2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸三丁胺盐的水溶液, 此水溶液经过高真空下低温旋转蒸发除掉绝大部分水溶液, 剩下的溶液加入 1mL 无水干燥的 DMF, 再次在高真空下低温旋转蒸发除去溶剂, 此过程再重复两次, 然后将此除去水的 2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸三丁胺盐溶于 2mL 的无水干燥 DMF, 在室温搅拌情况下, 将步骤 1) 中得到的荧光标记的三偏磷酸中间体 2 的乙腈溶液 2mL 通过注射器抽取并添加到此反应液中, 随后加入无水 $MgBr_2 \cdot Et_2O$ (0.4 μ mol) 的 DMF 溶液, 此混合物在室温下搅拌反应 8-24 小时, 反应进程使用 HPLC 跟踪检测, 待产物峰不再增加, 即可停止反应。将此反应液在高真空下低温旋转蒸发除去绝大部分的 DMF 溶剂, 再将残留物溶于 3mL 的 100mM 的醋酸三乙胺缓冲液 (PH 7.6), 此溶液经反相分离色谱分离提纯, 采用 Agela 中压制备色谱仪, AQ C-18-60g 制备柱分离。梯度洗脱: 流动相 A 为 50mM 醋酸三乙胺缓冲液, PH 为 7.5; 流动相 B 为色谱纯乙腈, 洗脱程序为: 0-15min 由 A 增加到 20% B, 15-35min B 成分增加到 40%, 流速 15mL/min, 收集含有目标成分馏分, 减压浓缩, 经高效液相色谱分析纯度约 90%, 精细的分离纯化采用高效液相色谱系统, Inertsil C18 半制备柱分离纯化, 流速为 3mL/min, 流动相 A 为 50mM 醋酸三乙胺缓冲液, PH 为 7.5; 流动相 B 为色谱纯乙腈, 梯度洗脱程序为: 0-15min 由 A 增加到 20% B, 15-25min 由 B 成分增加到 30%, 25-35min 增加到 50%。收集纯产物馏分, 低温浓缩, 测定浓度后放置于 -20 $^{\circ}C$ 冰箱中保存备用。纯品经 MALDI-TOF 质谱分析, 目标产物 dA6P' (或简称 TG-dA6P) 分子组成及计算值 $C_{31}H_{33}N_5O_{24}P_6$, m/z 1045.9975。实测值 (负离子模式) 1045.1721 (M-H), 1067.1470 (M+Na-2H), 1083.1217 (M+K-2H)。该 2'-脱氧核苷六磷酸酯产率约为 68%。

[0062] 其他三种 5'- ζ -末端磷酸荧光标记的 2'-脱氧核苷六磷酸酯 (TG-dG6P, TG-dC6P, TG-dT6P) 按照本实施例 4 所述方法分别合成。其结构如下:

[0063]



[0064]



[0065] 实施例 5

[0066] 5' - δ - 末端磷酸荧光标记的 2' - 脱氧核苷四磷酸酯的合成按照本实施例 4 所述方法进行, 只需将 2' - 脱氧核苷 -5' - 三磷酸钠盐替换为 2' - 脱氧腺苷 -5' - 单磷酸钠盐。

[0067] 实施例 6

[0068] 5' - ε - 末端磷酸荧光标记的 2' - 脱氧核苷五磷酸酯的合成按照本实施例 4 所述方法进行, 只需将 2' - 脱氧核苷 -5' - 三磷酸钠盐替换为 2' - 脱氧腺苷 -5' - 二磷酸钠盐。

[0069] 实施例 7

[0070] 根据实施例 4 所述四种 5' - ζ - 末端磷酸荧光标记的核苷六磷酸酯 (TG-dN6P) 在 DNA 序列测定方面的应用。

[0071] 首先将用于序列测试的 ssDNA 模板通过不对称固相 PCR 的方式固载到玻璃芯片表面上: 将芯片表面已经种植有引物的通道内注入 PCR 混合液, 其中包括 1μM 的引物 1; 125nM 的引物 2; 100nM 的 DNA 模板; 0.3U/μL 的 DNA 聚合酶 (Platinum Taq (Life technology)), 3mM 的镁离子, 1x 标准 Taq 缓冲液。先做 15 ~ 20 个循环的预扩增 (95°C 30s, 65°C 15s, 72°C 45s), 以产生足够多的单链 DNA 模板, 然后作 20 ~ 30 个循环的扩增 (95°C 30s, 65°C, 150s) 以便预扩增的 ssDNA 与芯片表面引物退火并有效延伸。PCR 之后, 纯水清洗芯片表面 10min, 最终获得约含有 5fmol/mm² 待测序列浓度的芯片表面。

[0072] 测序开始前, 将四种 5' - ζ - 末端磷酸荧光标记的 2' - 脱氧核苷六磷酸酯 T6-dN6P 分别单独放置于 4°C 冷却的样品瓶中并稀释至 1μM (使用缓冲液为 50mM Tris-HCl pH 7.9, 50mM NaCl, 0.1% tween-20, 1mM MnCl₂, 1mM DTT), 同时样品瓶中也包括碱性磷酸酶 (CIP), DNA 聚合酶 (Bst)。测序时, 每一次向芯片通道中加入一种 TG-dN6P, 然后升温至 65°C 引发聚合酶工作, 释放出带有荧光标记的多聚磷酸片段链, 碱性磷酸酶快速分解此多聚磷酸链并释放出荧光染料核心分子, 聚合反应完成后降低温度至室温, 在激发光下产生荧光信号, 该信号与聚合酶正确识别和结合到模板上的碱基数量呈线性关系。完成信号拍照采集后冲洗芯片通道 (50mM Tris-HCl pH 7.9, 50mM NaCl, 0.1% tween-20, 1mM EDTA, 1mM DTT), 进行下一个标记底物 TG-dN6P 的加入, 如此完成依次循环进行, 直到测序完成。

本测序方法并不局限特定的序列,只需要根据实际样品来源进行相应的建库处理,并在特定的反应芯片上进行表面样品扩增即可。本方法具有测序反应周期短(每轮反应及信号采集不超过3分钟),荧光信号强(处于末端磷酸标记状态下的荧光分子量子产率和吸光系数非常低,因此荧光背景极低,而被磷酸酶分解释放后的荧光分子量子产率和吸光系数很高),准确度高,读长较长等特点。本发明中,所有的无水操作都是在氩气或其它惰性气体保护下、经过烘干的反应器中进行。所用到的化学原料、试剂、溶剂等如不特别说明,均表示为直接购买的分析纯或化学纯试剂。反相制备色谱使用 Agela Cheetah-2 中压制备色谱仪, Agela AQ C-18 制备柱分离。反相分析色谱使用岛津 LC-20A 液相色谱系统。样品纯度分析使用 Inertsil ODS-3 C18 色谱柱(250×4.6mm,5 μm)。流速为 1mL/min,流动相 A 为 50mM 醋酸三乙胺缓冲液,PH 为 7.5;流动相 B 为色谱纯乙腈,梯度洗脱程序为:0-15min 由 A 增加到 20% B,15-25min 由 B 成分增加到 30%。

[0073] 实施例 8

[0074] 根据实施例 5 所述的 2'-脱氧核苷四磷酸酯,在实施例 7 所述的相同测序条件下用作基因测序,其测序反应速度(每一轮测序反应完成所需要的时间)要慢于 TG-dN6P,在整体结果上表现为获得相同读长所需的样品测序时间更长,其原因为聚合酶对带有不同长度磷酸链的核苷酸的识别和结合速度不同,并由此影响到测序准确度以及反应时间延长造成的错配等误差增加。

[0075] 实施例 9

[0076] 在实施例 4 的基础上,如果荧光分子的活性链接基团由羟基改为氨基或者其他基团,则所形成的末端磷酸荧光标记的核苷酸结构不能被磷酸酶所切除,因而无法释放荧光分子,导致不能产生荧光信号。

[0077] 本发明的具体实施方式是对于本发明技术方案的进一步描述,是为了更好的描述本发明要求保护内容的效果而选择的,并不是对于发明内容的限制。其步骤、参数等,比如实施例 4 中具体参数是本领域技术人员根据本发明的构思可以选择的。

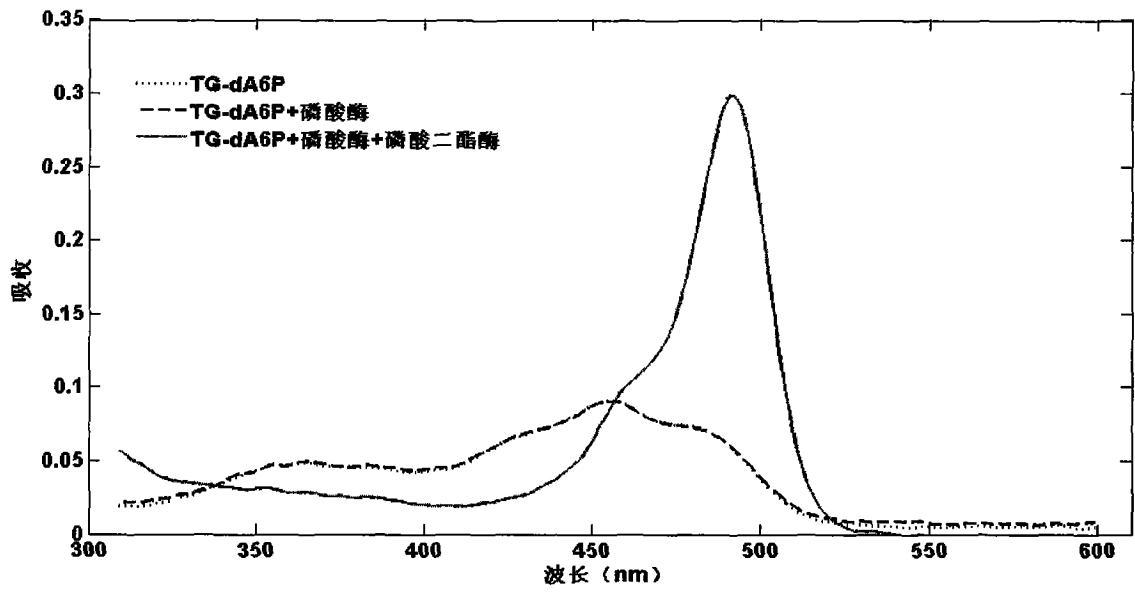


图 1

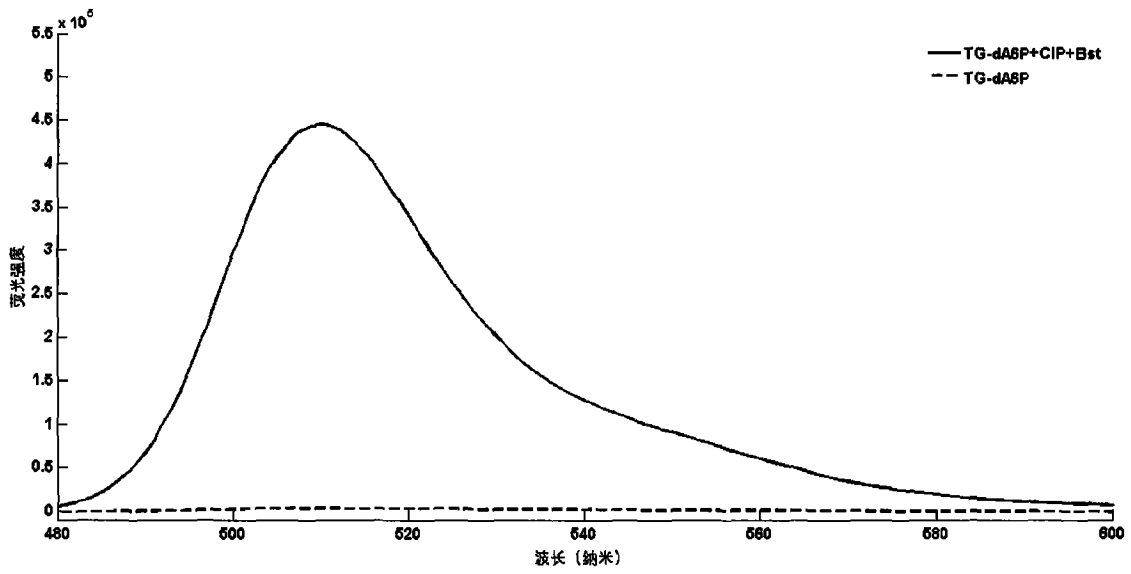


图 2

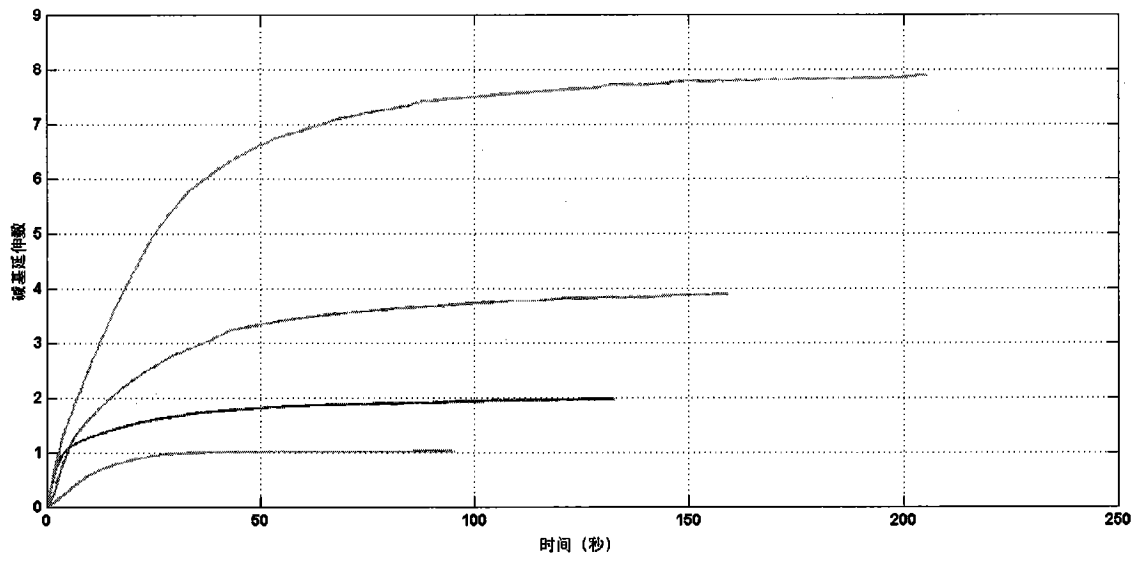


图 3